

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau International



4

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 1/04, 7/00, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02522
			(43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01308		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)			
(30) Données relatives à la priorité: 96/08851 16 juillet 1996 (16.07.96) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).			
(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): SENE, Claude [FR/FR]; 12, rue Foch, F-67190 Mutzig (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Title: METHOD FOR PRESERVING INFECTIOUS RECOMBINANT VIRUSES, AQUEOUS VIRAL SUSPENSION AND USE AS MEDICINE			
(54) Titre: PROCEDE DE CONSERVATION DE VIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX, SUSPENSION AQUEUSE VIRALE. ET UTILISATION COMME MEDICAMENT			
(57) Abstract <p>The invention discloses a method for preserving infectious recombinant viruses in frozen or liquid form, in which the viruses are preserved in an aqueous solution containing saccharose at a concentration higher than 0.75 M, preferably between 0.75 and 1.5 M, or more preferably at a concentration of 1 M, and an aqueous viral suspension and its use as medicine.</p>			
(57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme congelée ou liquide, dans lequel les virus sont conservés dans une solution aqueuse comprenant du saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore à une concentration égale à 1 M, ainsi qu'une suspension aqueuse virale et son utilisation comme médicament.</p>			

20634
#4

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bразил	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE CONSERVATION DE VIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX,
SUSPENSION AQUEUSE VIRALE ET UTILISATION COMME MEDICAMENT

L'invention concerne un procédé de conservation de virus
5 recombinaux infectieux, une suspension aqueuse virale, et son utilisation
comme médicament.

Les virus vivants ont de nombreuses applications, en particulier
comme vaccins. Ce sont des particules qui possèdent un génome sous forme
d'ADN ou d'ARN contenant les informations utiles à leur replication, mais qui
10 ont besoin d'infecter une cellule hôte pour réaliser la synthèse des protéines
qui leur sont nécessaires.

Par ailleurs, la possibilité d'intégrer dans un génome de virus du
matériel génétique étranger a permis de créer des virus dits recombinaux
portant un gène d'intérêt thérapeutique utilisés pour transférer ce gène
15 dans des cellules spécifiques de patients déficients. C'est le principe de la
thérapie génique.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie
génique est passée en quelques années du stade des considérations théoriques
à celui des applications cliniques. La grande majorité des protocoles décrits
20 jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux pour transférer et
exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter.

A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés du
fait de la simplicité de leur génome, bien qu'ils présentent une capacité de
clonage assez restreinte.

25 Les adénovirus, quant à eux, offrent plusieurs avantages qui en
font des vecteurs de choix pour une grande variété d'applications. En effet,
ils infectent de nombreux types cellulaires, sont non-intégratifs, peu
pathogènes et peuvent se répliquer dans les cellules en division ou
quiescentes. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN
30 linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de
gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la replication virale (E1 à E4 ;
E pour early, signifiant précoce en anglais) et des gènes tardifs de structure
(L1-L5 ; L pour late, signifiant tardif en anglais).

Les vecteurs adénoviraux recombinaux utilisés à des fins de
35 thérapie génique sont déficients pour la replication afin d'éviter leur
dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. D'une manière
générale, ils sont dépourvus de la majorité de la région E1 et certains

d'inflammation liés à l'expression des gènes viraux restants. Ils ne peuvent être propagés que par transcomplémentation des fonctions adénovirales pour lesquelles ils sont déficients. A l'heure actuelle, on utilise essentiellement la lignée de complémentation 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) ou des lignées en dérivant (Yeh et al., 1996, J. Virol. 70, 559-565 ; Wang et al., 1995, Gene Therapy 2, 775-783 ; Krougliak et Graham, 1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586).

Les adénovirus sont notamment utilisés dans le cas du traitement de la mucoviscidose par thérapie génique (Pavirani et al., 1996, médecine / sciences 12, 25-33).

Les virus recombinants ne sont cependant utilisables que si leur viabilité et leur infectuosité ont été convenablement préservés pendant toute la période de stockage.

Traditionnellement, les adénovirus purifiés sont conservés dans une solution saline contenant du glycérol de 10 à 30 % (Graham et al., 1991, Methods in Molecular Biology, vol. 7, chap. 11, p. 109-127 ; Ed Murrey, The Human Press Inc. ; Precious et Russel, Virology, a Practical Approach, 1985, chap. 9, p. 193-205 ; ed : BW Mahy, IRL Press, Washington DC ; Kanegae et al., Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47, 157-166, 1994 et Green et al., Methods in enzymology, vol. LVIII, p. 425-435). Cependant, le glycérol présente l'inconvénient d'être irritant pour l'épithélium pulmonaire, ce qui peut être délicat dans le cadre d'une administration intratrachéale et intrapulmonaire (par exemple pour le traitement de la mucoviscidose ou de cancers des voies pulmonaires). De plus, si cette solution permet la conservation des adénovirus sous forme congelée, elle ne permet pas de maintenir leur activité à + 4°C au-delà d'une semaine.

L'addition de sucrose à faible concentration (1 à 5 %) dans une solution saline a également été décrite (Precious et al., voir ci-dessus ; Huyghe et al., Human Gene Therapy 6:1403-1416, Novembre 1995, et Hehir, Process Development and Production Issues for Viral Vectors & Vaccines, The Williamsburg Bio Processing Conference, 2nd annual meeting, 6-9 Novembre 1995) permettant une stabilité des adénovirus à long terme sous forme congelée, mais seulement à court terme à + 4°C (Hehir, voir ci-dessus).

La conservation des virus sous forme congelée posant des problèmes de stockage et de transport, il a également été envisagé de préserver les virus et les vaccins viraux sous une forme lyophilisée. Cependant, cette technique présente l'inconvénient d'entraîner souvent une

perte de l'activité virale. Pour pallier cela, l'addition d'excipients comme les sucres (sucrose, glucose, tréhalose), permet de maintenir l'activité virale sous forme lyophilisée (WO 95/10601 - Viagene et EP-O 357 709 - Quadrant). L'emploi du lactose ou du saccharose à faible concentration (2,5 - 5 %) pour la
5 préservation du virus vivant atténué sous forme lyophilisée a également été préconisée (JP-88 555465 - Kitasako Inst.).

Aucune des solutions proposées jusqu'à présent n'a permis de maintenir l'activité des adénovirus à des niveaux satisfaisants pendant plus de 6 mois, tout en évitant les problèmes secondaires tels que les problèmes
10 d'irritation.

La présente invention remédie aux inconvénients de l'art antérieur. Elle a pour objet un procédé de conservation à long terme de virus recombinants infectieux tant sous forme liquide que sous forme congelée, dans lequel les virus recombinants sont conservés dans une solution aqueuse
15 comprenant du saccharose à haute concentration.

En effet, si l'utilisation du saccharose à haute concentration est connue depuis longtemps pour conserver les protéines ou autres produits biologiques (Timasheef et al., In Protein Structure, a Practical Approach, 1989, Ed Creighton, chap. 14, p. 331-345, IRL Press, Oxford, et Doebbler, Cryobiology, vol. 3, N° 1, 1966) ou pour la cryopréservation des cellules
20 vivantes dans l'azote liquide (Grout et al., Tibtech, Octobre 1990, vol. 8, p. 293-297), elle n'a jamais été proposée pour la conservation des virus.

Or, les résultats obtenus par la mise en oeuvre du procédé selon l'invention ont démontré un effet cryoprotecteur du saccharose à différentes
25 températures de stockage (- 80 °C, - 40°C, - 20°C et + 4°C) et ceci d'autant plus que la concentration en saccharose est élevée.

Avantageusement, les virus recombinants infectieux concernés par la présente invention sont des poxvirus, des adénovirus, des virus associés aux adénovirus et des rétrovirus.

30 Dans le cadre de l'invention, les virus sont conservés dans une solution aqueuse comprenant du saccharose à haute concentration, c'est-à-dire à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore à une concentration égale à 1 M.

35 Selon un mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, les virus recombinants infectieux gagnent en stabilité quand la solution aqueuse utilisée présente un pH basique compris entre 8 et 9, et de

préférence égal à 8,5.

Ainsi, la solution aqueuse mise en oeuvre dans le cadre de la présente invention peut être une solution tampon choisie parmi le tampon Tris, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate/HCl, Glycine /
5 NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propanesulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine.

Avantageusement, il est possible de stabiliser davantage la capside ou l'enveloppe virale des virus conservés selon l'invention en ajoutant à la
10 solution aqueuse utilisée, au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi le $MgCl_2$, le $CaCl_2$ et le $MnCl_2$, le $MgCl_2$ étant préféré.

Dans le cadre de la présente invention, le sel de cation divalent est utilisé à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

15 Selon un mode de réalisation avantageux de procédé conforme à l'invention, les virus sont conservés dans une solution tampon comprenant un tampon Tris HCl 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

On peut encore améliorer la conservation des virus en utilisant au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence
20 monovalents tels que le NaCl ou le KCl qui procurent une force ionique à la solution, des acides aminés tels que Gly, Leu, Lys, Arg, Asp, Val, Glu et les composés agissant sur la tension de surface tels que le Tween 80 ou le Triton X-100, ces derniers pouvant être utilisés seuls ou en présence de sels.

Avantageusement, à titre de composé stabilisant, le NaCl est utilisé à
25 une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence entre 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M, la concentration considérée comme optimale étant de 0,15 M, et le Tween 80 est utilisé à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 % en poids par rapport à la solution totale (soit entre 10 mg/l et 5 g/l), de préférence entre 0,002 et 0,2 % en poids
30 et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention met en oeuvre une solution aqueuse de pH environ 8,5 comprenant du Tris-HCl 10 mM, du $MgCl_2$ 1mM, du NaCl 0,9 % (ou 150 mM) de Tween 80 50 mg/l (0,05 %) et du saccharose 1 M.

35 De plus, les virus recombinants infectieux conservés selon le procédé conforme à l'invention, peuvent être soumis à une lyophilisation.

L'invention a également pour objet une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux dans une solution aqueuse de saccharose à haute concentration telle que précédemment décrite.

Avantageusement, la suspension aqueuse conforme à l'invention
5 comprend de 10^6 à 10^{13} pfu/ml de virus recombinants infectieux.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux telle que ci-dessus décrite ou obtenue par la mise en oeuvre du procédé de conservation conforme à l'invention, en association avec un
10 véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Elle peut être administrée par voie systémique, en particulier par voie sous-cutanée, intraveineuse, intracardiaque, intramusculaire, intrapéritonéale, intragastrique, intratumorale, intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs
15 fois après un certain délai d'intervalle. La formulation peut également inclure d'autres composés tels qu'un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention est, en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète, myopathie de
20 Duchenne et de Becker, ...), les cancers, les maladies virales (hépatites, SIDA, ...) et les maladies récurrentes (infections provoquées par le virus de l'herpès, le papilloma humain, ...).

Enfin, la présente invention est relative à l'usage thérapeutique ou prophylactique d'une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux
25 telle que ci-dessus décrite ou obtenue par la mise en oeuvre du procédé de conservation conforme à l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. La suspension aqueuse peut être administrée directement in vivo (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible,
30 dans les poumons par aérosol, ...). On peut également adopter l'approche ex vivo qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires, ...), de les infecter par la suspension aqueuse de l'invention selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient.

35 La figure 1 illustre l'influence du pH de la solution de saccharose sur la stabilité virale.

La figure 2 illustre l'influence de l'addition à la solution de

saccharose de Tween 80 et de NaCl. L'unité de l'ordonnée est exprimée en pfu/ml.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lumière des exemples suivants.

5

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les exemples qui suivent mettent en oeuvre un vecteur adénoviral recombinant exprimant soit le gène marqueur *LacZ* codant pour la β -galactosidase d'*E. coli* ou le gène thérapeutique CF codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) déficiente
10 chez les patients atteints de mucoviscidose. A titre indicatif, le vecteur est obtenu à partir du génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5) délété des régions E1 et E3, et comprend, intégrée à la place de la région E1, une cassette pour l'expression du gène marqueur ou thérapeutique (Stratford-Perricaudet et
15 al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626-630 ; Rosenfeld et al., 1992, Cell. 68, 143-155). Il peut être propagé dans la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72) complétant la fonction E1 essentielle à la réplication virale. A titre indicatif, la lignée 293 dérive de rein embryonnaire humain et résulte de l'intégration dans ses chromosomes de l'extrémité 5' du génome de l'Ad5
20 (11 %). Les cellules 293 sont disponibles à l'ATCC (CRL1573) et sont cultivées selon les conditions préconisées par le fournisseur ou dans la littérature.

Un stock viral primaire est constitué de manière conventionnelle dans les cellules 293 transfectées par le vecteur adénoviral décrit ci-dessus. On vérifie la production de particules virales infectieuses recueillies après
25 lyse des cellules par des cycles consécutifs de congélation-décongélation, le titre de la préparation virale par la méthode agar (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol. 7, p 109-128 ; Ed: E. J. Murey, The Human Press Inc.) et l'expression du gène marqueur par coloration au Xgal (4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -galactosidase) selon la procédure de Sanes et al.
30 (1986, EMBO J. 5, 3133-3142) ou du gène CF par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques (Dalemans et al., 1992, Experimental Cell Research 201, 235-240). La préparation virale peut être purifiée et concentrée par gradient de densité préalablement à son utilisation.

35 EXEMPLE 1 :

Influence du pH sur la stabilité du virus

Une suspension virale est préparée de la manière suivante.

Les cellules 293 sont cultivées en CellCube (Costar) dans un milieu GMEM supplémenté avec 7 % de sérum de veau foetal (FCS). Lorsqu'elles atteignent la confluence, elles sont infectées par une aliquote du stock primaire du vecteur adénoviral exprimant le gène CF à une m.o.i. (multiplicité d'infection) de 2. Trente heures après l'infection, les cellules qui sont fragilisées, sont détachées par agitation mécanique ou à l'aide d'un agent chimique et récoltées par centrifugation à basse vitesse (3 500 rpm (révolutions par minute) pendant 8 minutes). Elles sont lysées et les particules virales libérées par 3 séries de congélation-décongélation et les débris cellulaires éliminés par centrifugation (3 500 rpm pendant 8 minutes). Le virus est purifié à partir du surnageant par deux ultracentrifugations sur chlorure de césium (CsCl), la première sur coussins de CsCl de densité $d = 1,25$ et $d = 1,40$ respectivement (141 000 g pendant 2 heures) et la seconde sur un gradient autoformé à partir d'une solution de CsCl de densité $d = 1,34$ (231 000 g pendant 18 heures).

La bande de virus est récupérée, son titre déterminé (2×10^{11} pfu) et la préparation est divisée en 4 lots qui sont soumis à une dialyse à 4°C contre 4 fois 250 ml de tampon Tris 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, glycérol 10 %, de pH croissant : pH 7,4, pH 8, pH 8,5 et pH 9 respectivement. La stabilité virale dans les différents tampons de formulation est étudiée en parallèle (étude de stabilité accélérée). Pour ce faire, chaque lot est conditionné en cryotubes de 1 ml contenant chacun 100 μ l de suspension. Les échantillons sont incubés à 37°C et prélevés à t_0 et après 4, 24 et 72 h d'incubation. Ils sont conservés à - 20°C jusqu'au titrage. Le titre viral est déterminé par la méthode agar par réinfection de cellules 293 par différentes dilutions de l'échantillon à tester. Les résultats sont donnés en pfu (unité formant des plages)/ml.

Les résultats présentés sur la Figure 1 montrent que la formulation à pH basique préserve l'activité infectieuse des adénovirus. En effet, le titre des préparations formulées dans les tampons à pH 8,5 et 9 sont stables pendant 24 heures à 37°C puis diminuent progressivement au cours du temps. En revanche, les virus placés dans un tampon à pH 7,4 et 8 perdent leur pouvoir infectieux dès le début de l'incubation à 37°C. Après 24 heures, les titres sont déjà très bas (10^3 à 10^4 pfu/ml contre de l'ordre de 10^{10} au départ) et les virus ne sont pratiquement plus infectieux au bout de 72 heures.

EXEMPLE 2 :**Influence de la concentration en Saccharose sur la stabilité du virus**

Une suspension virale est préparée comme décrit à l'exemple 1 avec les quelques modifications suivantes :

- les cellules sont infectées par le vecteur adénoviral exprimant le gène *LacZ* ;
 - les cellules infectées sont lysées de manière mécanique (homogénéiseur Silversen ; référence L4R) ;
 - les ultracentrifugations en gradient de CsCl sont réalisées à l'aide de rotors à angle fixe (235 000 g pendant 2 h pour la première et 435 000 g pendant 18 h pour la seconde) ;
 - la dialyse est remplacée par une étape de chromatographie de filtration sur gel à l'aide de la matrice Trisacryl GF05 LS (Biosepra, référence 259161) permettant un dessalage de la solution par élimination du CsCl ;
 - les virus sont formulés dans une solution de Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM et saccharose 1 M d'un pH de 8,5 avant d'être répartis en 5 lots par dilution au 1/20 dans les tampons indiqués ci-après et préalablement filtrés sur membrane de porosité 0,22 µm
- Lot 1) Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM Saccharose 1 M pH 8,5
Lot 2) Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM Saccharose 0,75 M pH 8,5
Lot 3) Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM Saccharose 0,5 M pH 8,5
Lot 4) Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM Saccharose 0,25 M pH 8,5
Lot 5) Tris-HCl 10 mM MgCl₂ 1 mM Saccharose 0 M pH 8,5

Chacun des lots titre au départ environ 10¹⁰ pfu/ml. La stabilité des virus est mesurée en condition accélérée (37°C) sur des aliquotes prélevées régulièrement.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1

Influence de la concentration en saccharose sur la stabilité du virus à 37°C

5	Titre (pfu/ml) Temps	①	②	③	④	⑤
	8 h	$1,27 \times 10^{10}$	$1,25 \times 10^{10}$	$1,22 \times 10^{10}$	$1,32 \times 10^9$	$2,77 \times 10^6$
10	24 h	$8,5 \times 10^9$	$5,02 \times 10^9$	$1,47 \times 10^9$	$< 10^4$	$< 10^4$
	48 h	$3,82 \times 10^9$	4×10^7	$3,25 \times 10^6$	$< 10^4$	$< 10^3$
15	72 h	$2,37 \times 10^9$	$7,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$< 10^4$	$< 10^3$
	1 sem	$4,5 \times 10^6$	$< 10^4$	$< 10^3$	$< 10^3$	$< 10^2$
	2 sem	$2,5 \times 10^2$	5	< 10	< 10	< 10
20	1 mois	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

- ① Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Saccharose 1 M, pH 8,5
 ② Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Saccharose 0,75 M, pH 8,5
 ③ Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Saccharose 0,5 M, pH 8,5
 ④ Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Saccharose 0,25 M, pH 8,5
 ⑤ Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Saccharose 0 M, pH 8,5

De cette étude, il ressort que plus la concentration en saccharose est élevée, plus l'activité virale est préservée (lot 1 plus stable que le lot 2 lui-même plus stable que le lot 3, etc.). En absence de saccharose (lot 5), le pouvoir infectieux chute très rapidement (diminution d'un facteur 5000 dès 8 heures d'incubation). En présence de 0,25 M (lot 4), le titre diminue rapidement mais à un moindre degré (diminution d'un facteur 10 après 8 heures à 37°C). En augmentant encore les concentrations en saccharose (lots 1, 2 et 3), le titre se maintient pendant plus de 8 heures puis décroît progressivement au fur et à mesure de l'incubation. La décroissance est cependant minime lorsque la concentration en saccharose atteint 1M (lot 1).

EXEMPLE 3 :

Etude de la stabilité à long terme dans le tampon de formulation Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5

5 L'étude est réalisée à partir de la suspension virale obtenue à l'exemple 2, dont on étudie la stabilité en conditions long terme à + 4°C et - 20°C. Le titre viral est suivi au cours du temps par titrage agar et les résultats indiqués dans le tableau 2 ci-après montrent une stabilité des préparations virales formulées en présence de saccharose 1 M et à pH 8,5
10 pendant au moins 6 mois.

Tableau 2

Etude de stabilité à + 4°C et - 20°C d'une préparation virale formulée en saccharose 1M.

15 Titres viraux en pfu/ml :

Temps	+ 4°C	- 20°C
20 t_0	$4,8 \times 10^9$	
1 mois	1×10^{10}	$9,75 \times 10^9$
2 mois	$9,25 \times 10^9$	$1,38 \times 10^{10}$
25 3 mois	$1,32 \times 10^{10}$	$1,05 \times 10^{10}$
6 mois	$1,1 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$
30 1 an	$3,7 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$

Le tampon de formulation en saccharose 1 M a également été comparé au tampon conventionnel (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, glycérol 10 %, pH 7,4). Cette étude a été menée à + 4°C sur une suspension virale diluée à un titre final d'environ 10^{10} pfu/ml dans les 2 types de tampon. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3

Etude de la stabilité à + 4°C d'une préparation virale
formulée en saccharose 1 M ou en glycérol 10 %

5

10

15

Temps	Titres viraux en pfu/ml	
	①	②
t = 0	2,5 x 10 ¹⁰	1,0 x 10 ¹⁰
t = 1 mois	ND	1,2 x 10 ³
t = 3 mois	2,5 x 10 ¹⁰	3,8 x 10 ³
t = 6 mois	2,6 x 10 ¹⁰	ND

20

① Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5

② Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, glycérol 10 %, pH 7,4

Le titre viral est stable pendant plus de 6 mois à + 4°C lorsque le tampon de formulation comprend du saccharose 1 M et à un pH légèrement basique alors qu'il décroît dès le premier mois lorsque les virus sont placés à pH neutre et en présence de glycérol 10 %.

25

EXEMPLE 4 :**Optimisation du tampon de formulation**

La suspension virale obtenue à l'exemple 2 est répartie en 2 lots dilués au 1/20 dans le tampon de formulation utilisé pour le lot 1) non supplémenté ou en présence de Tween 80 50 mg/l (0,005 %) et NaCl 150 mM. La stabilité est analysée à 37°C et à 4°C.

Les résultats de stabilité accélérée (Figure 2) montrent que l'ajout d'agents conservateurs tels que le Tween 80 et le sel améliore encore la stabilité des virus formulés en tampon Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5. L'activité infectieuse se maintient pendant 24 h à 37°C en leur présence au lieu de 8 h en leur absence.

35

Par ailleurs, la présence des 2 agents conservateurs ne nuit pas à la stabilité de la préparation virale à + 4°C puisque le titre s'avère stable pendant plus de 6 mois.

5 **EXEMPLE 5 :**

Stabilité dans le tampon de formulation Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1mM, NaCl 0,9 %, Tween 80 50 mg/l et saccharose 1 M, pH 8,5.

10 Une suspension virale comme décrit à l'exemple 2 formulée dans une solution de Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1mM et saccharose 1 M est diluée au 1/20 dans le tampon de formulation suivant :

15	Tris-HCl	10 mM
	MgCl ₂	1 mM
	NaCl	0,9 % (150 mM)
	Tween 80	50 mg/l
	Saccharose	1 M
	pH 8,5	

20

L'échantillon est conditionné en cryotubes de 1 ml, contenant chacun 100 µl de suspension virale. Les cryotubes sont conservés à + 4°C et les titres viraux déterminés à t₀ et régulièrement dans le temps pendant 1 an. Les échantillons sont conservés à - 20°C jusqu'au titrage. Les résultats sont
25 présentés dans le tableau 4 suivant et montrent une stabilité des virus pendant au moins 1 an.

Tableau 4

5	Temps de conservation à 4°C	Titre en pfu/ml
	t_0	$5,5 \times 10^9$
10	2 semaines	$5,6 \times 10^9$
	1 mois	23×10^9
	2 mois	4×10^9
15	3 mois	$5,6 \times 10^9$
	6 mois	$4,5 \times 10^9$
20	1 an	$2,5 \times 10^9$

REVENDICATIONS

1/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme congelée ou liquide, dans lequel les virus sont conservés dans une solution aqueuse comprenant du saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement à une concentration égale à 1 M.

2/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 1, dans lequel les virus sont des adénovirus ou des rétrovirus.

3/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le pH de la solution aqueuse est compris entre 8 et 9, de préférence le pH est égal à 8,5.

4/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la solution aqueuse est une solution tampon.

5/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 4, dans lequel la solution tampon est choisie parmi le tampon Tris-HCl, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate / HCl, Glycine / NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propane sulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine, le tampon Tris-HCl étant préféré.

6/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la solution aqueuse comprend en outre au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi $MgCl_2$, $CaCl_2$ et $MnCl_2$, $MgCl_2$ étant préféré.

7/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 6, dans lequel le sel de cation divalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

8/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel la solution aqueuse comprend un tampon Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

9/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel la solution aqueuse

comprend au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence monovalents, les acides aminés et les tensio-actifs.

10/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 9, dans lequel le sel monovalent est choisi parmi NaCl et KCl, le NaCl étant préféré.

11/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 10, dans lequel le sel monovalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M.

12/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 9, dans lequel le tensio-actif est le Tween 80 ou le Triton X-100.

13/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 12, dans lequel le Tween 80 est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 %, de préférence entre 0,002 et 0,2 %, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids par rapport à la solution totale.

14/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon la revendication 13, dans lequel la solution aqueuse comprend un tampon Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 1mM, NaCl 150 mM, Tween 80 0,05 % et saccharose 1 M, pH environ 8,5.

15/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 14, dans lequel la température de conservation est inférieure ou égale à + 4°C.

16/ Procédé de conservation de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel les virus en solution sont ensuite soumis à une lyophilisation.

17/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux comprenant une solution aqueuse de saccharose à une concentration supérieure à 0,75 M, de préférence comprise entre 0,75 M et 1,5 M, plus préférentiellement encore égale à 1 M.

18/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 17, caractérisée en ce que les virus sont des adénovirus ou des rétrovirus.

19/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle le pH de la solution aqueuse est compris entre 8 et 9, de préférence le pH est égal à 8,5.

20/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 19, dans laquelle la solution aqueuse est une solution tampon.

5 21/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 20, dans laquelle la solution tampon est choisie parmi le tampon Tris-HCl, les solutions triéthanolamine, diéthanolamine, borate / HCl, Glycine / NaOH, EPPS [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(3-propanesulfonique)], Bicine, TAPS [acide N-tris (hydroxyméthyl) méthyl-3-aminopropane sulfonique] et tricine, le tampon Tris-HCl étant préféré.

10 22/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 21, dans laquelle la solution aqueuse comprend en outre au moins un sel d'un cation divalent choisi parmi $MgCl_2$, $CaCl_2$ et $MnCl_2$, $MgCl_2$ étant préféré.

15 23/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 22, dans laquelle le sel de cation divalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,1 et 5 mM, de préférence entre 0,5 et 2 mM et encore plus préférentiellement, de l'ordre de 1 mM.

20 24/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 23, dans laquelle la solution aqueuse comprend un tampon Tris HCl 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, saccharose 1 M, pH 8,5.

25 25/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 23, dans laquelle la solution aqueuse comprend au moins un composé stabilisant choisi parmi les sels, de préférence monovalents, les acides aminés et les tensio-actifs.

26/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 25, dans laquelle le sel monovalent est choisi parmi NaCl et KCl, le NaCl étant préféré.

30 27/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 26, dans laquelle le sel monovalent est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,05 et 1 M, de préférence 0,1 et 0,5 M, plus préférentiellement encore entre 0,1 et 0,3 M.

35 28/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon la revendication 25, dans laquelle le tensio-actif est le Tween 80 ou le Triton X-100.

29/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon

la revendication 26, dans laquelle le Tween 80 est présent dans la solution aqueuse à une concentration comprise entre 0,001 et 0,5 %, de préférence entre 0,002 et 0,2 %, et plus préférentiellement encore de l'ordre de 0,005 % en poids par rapport à la solution totale.

30/ Suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 29, comprenant de 10^6 à 10^{13} pfu/ml de virus recombinants infectieux.

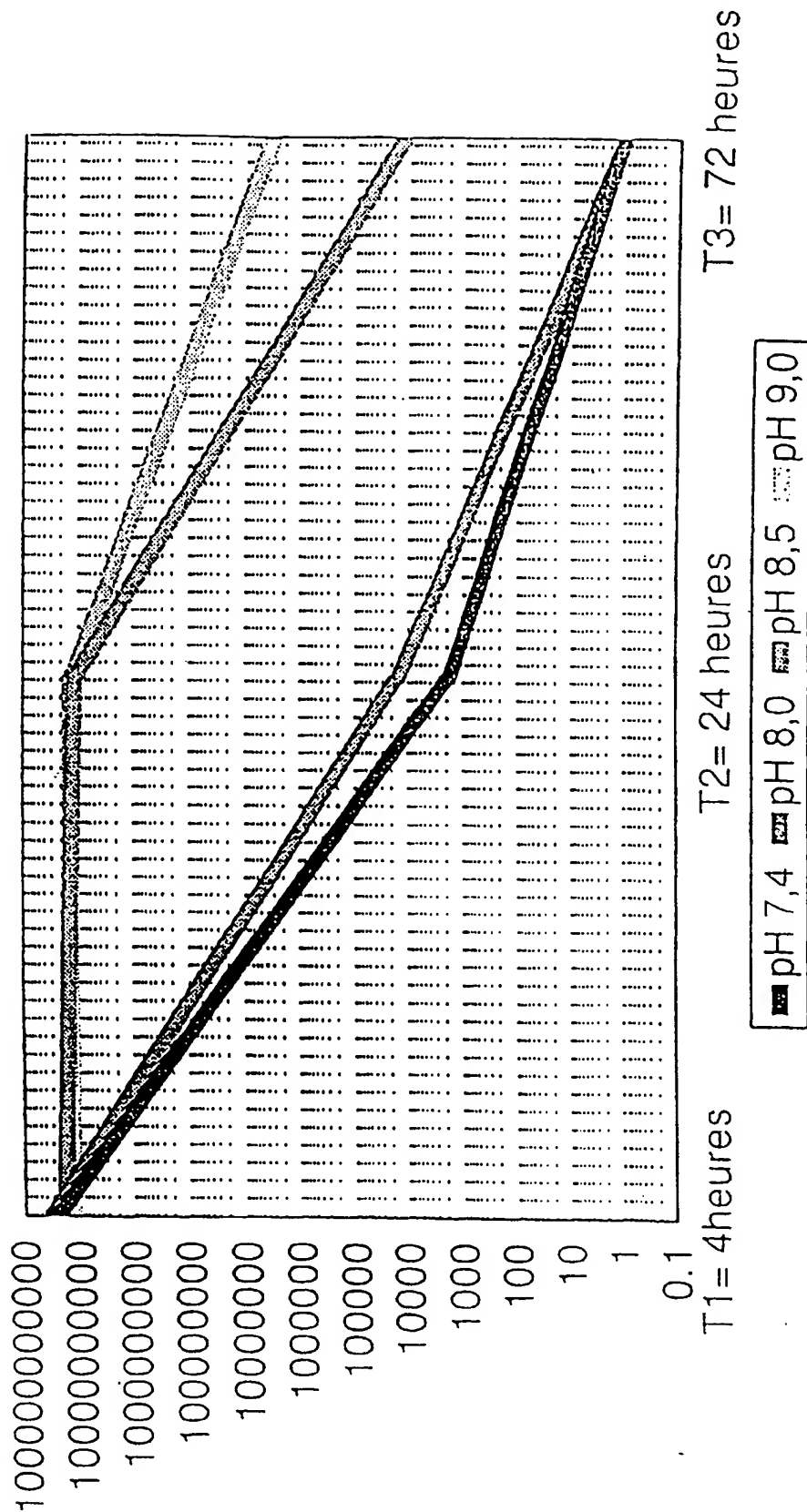
20 31/ Suspension aqueuse selon la revendication 29, comprenant un tampon Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 1mM, NaCl 150 mM, Tween 80 0,05 % et du saccharose 1M, pH environ 8,5.

25 32/ Composition pharmaceutique comprenant une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 30, ou obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé de conservation des virus recombinants infectieux selon les revendications 1 à 16, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

30 33/ Usage thérapeutique ou prophylactique d'une suspension aqueuse de virus recombinants infectieux selon l'une des revendications 17 à 30, ou obtenue par la mise en oeuvre d'un procédé de conservation des virus recombinants infectieux selon les revendications 1 à 16, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

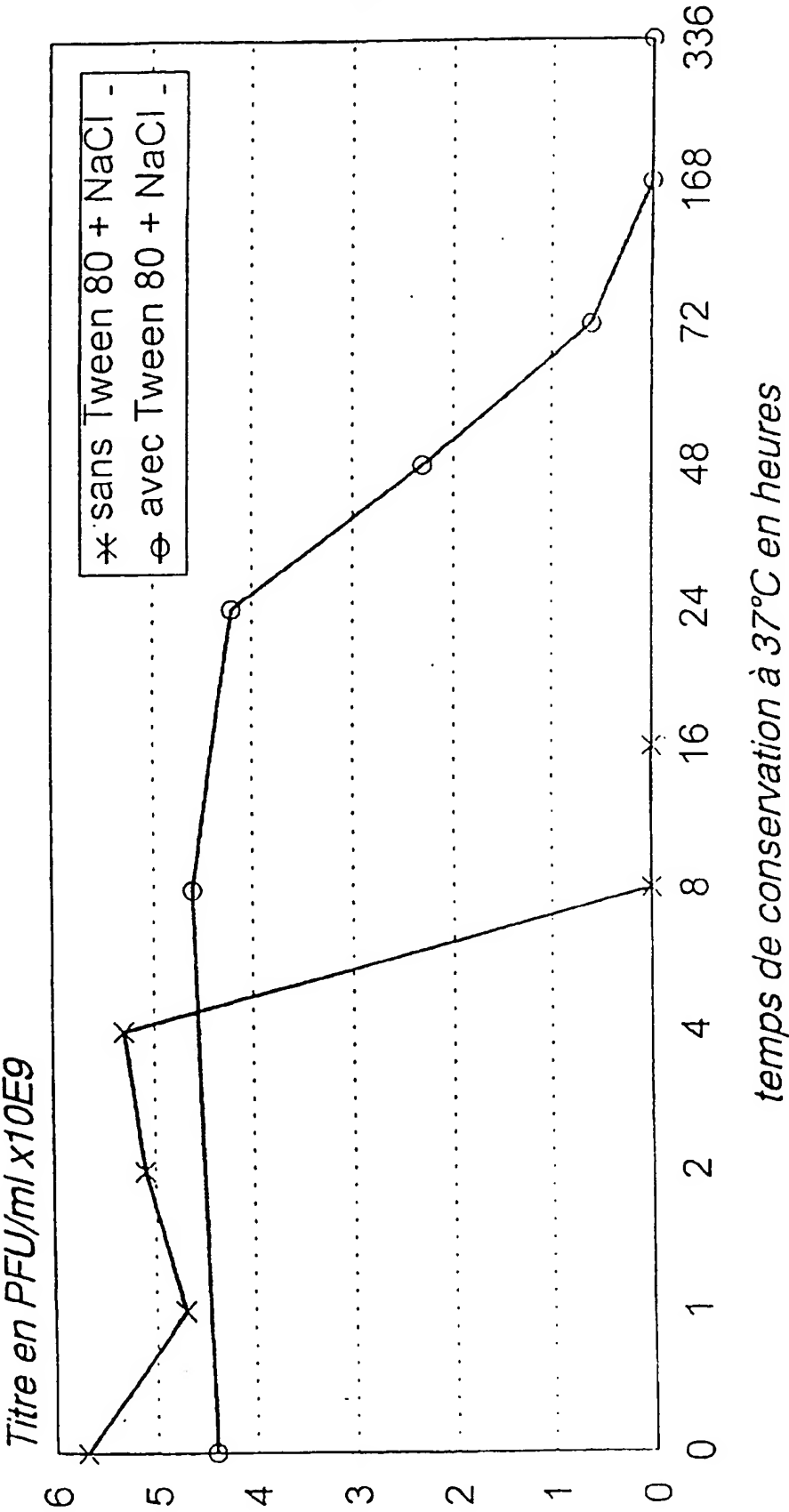
1/2

- Figure 1 -



2/2

- Figure 2 -



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/FR 97/01308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N1/04 C12N7/00 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 5 545 555 A (RACIOPPI STEPHEN G ET AL) 13 August 1996 see column 4, line 14 - column 5, line 40 ---	1-33
A	WO 95 10601 A (VIAGENE INC) 20 April 1995 cited in the application see page 3, line 16 - page 4, line 18 -----	1-33

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 1997

Date of mailing of the international search report

14. 11. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/01308

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons.

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Method for the therapeutical treatment of the human or animal body
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Application No

PCT/FR 97/01398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5545555 A	13-08-96	NONE	
WO 9510601 A	20-04-95	AU 7971194 A	04-05-95
		CA 2158935 A	20-04-95
		EP 0728195 A	28-08-96
		JP 9504429 T	06-05-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e internationale No

PCT/FR 97/01308

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N1/04 C12N7/00 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	US 5 545 555 A (RACIOPPI STEPHEN G ET AL) 13 août 1996 voir colonne 4, ligne 14 - colonne 5, ligne 40	1-33
A	WO 95 10601 A (VIAGENE INC) 20 avril 1995 cité dans la demande voir page 3, ligne 16 - page 4, ligne 18	1-33

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14. 11. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 97/01308

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 33 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Règle 39.1(iv) PCT - Méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4 a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. Internationale No

PCT/FR 97/01308

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5545555 A	13-08-96	AUCUN	
WO 9510601 A	20-04-95	AU 7971194 A	04-05-95
		CA 2158935 A	20-04-95
		EP 0728195 A	28-08-96
		JP 9504429 T	06-05-97